

등록특허번호 제0150193호(1998.12.01.) 1부.

특0150193

(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(51) Int. Cl. <sup>8</sup> G01N 31/00	(45) 공고일자 1998년12월01일
(21) 출원번호 특1989-001116	(11) 등록번호 특0150193
(22) 출원일자 1989년01월31일	(24) 등록일자 1998년06월12일
(30) 우선권 주장 8802237 1988년02월02일 영국(GB)	(65) 공개번호 특1989-013478
	(43) 공개일자 1989년09월23일

(73) 특허권자      바이오코드 인코포레이티드      제임스 에이처. 린텐버그  
미합중국 매사추세츠주 02630 번스타이빌 밀 웨이 275

(72) 발명자      마이클 존 웨이스  
영국 켄트주 싯팅보른시 버어클리 코오트 3  
데이빗 월리엄 브리튼  
영국 켄트주 패버섬 바이상웃드 로오드 86

(74) 대리인      차윤근

심사관 : 김호석

(54) 마커 화합물의 검출방법

요약

내용 없음.

명세서

[발명의 명칭]

마커 화합물의 검출 방법

[발명의 상세한 설명]

본 발명은 면역분석에 의해 화학제 마커 화합물들을 검출하는 방법과 이 분야에서 이러한 검출을 수행할 수 있는 분석 키트에 관한 것이다. 특히 본 발명은 액체 제품, 특히 유혈유와 같은 기체를 기제로 하는 제품에서 마커 화합물들을 검출하는 것에 관한 것이다.

세계의 여러 지역에서, 그리고 많은 상이한 제품들과 관련되어 겪게 되는 문제점은 모조 제품이 있다는 것이다.

세계 도처에서, 상인들은 고객들이 그들의 물질을 다른 것들로부터 식별할 수 있게 하기 위해서 육안으로 식별가능한 외관을 갖는, 이들이 판매하는 물질을 제공한다. 결과적으로 이들의 고객들은 어떤 품질 기준과 육안으로 식별가능한 물질의 외관을 관련시키는 것을 터득하여 이들이 그러한 기준들을 만족시킨다면 다른 것들에 선호하여 육안으로 식별가능한 외관이 제공된 물질들을 구입할 것이다.

일단 고객들이 육안으로 식별가능한 특정 외관이 제공되어 있는 물질들을 선호하기 시작하면, 상인들은 모조품에 영향받기 쉬워진다.

모조품은 진품이 갖는 물질의 외관과 혼동할 정도로 유사한, 육안으로 식별가능한 외관을 갖는 물질로 이루어져 있다. 모조 물질에 제공된 육안으로 식별가능한 외관을 본 고객들은 그들이 진품을 산다는 기대로 이 물질을 사게 된다.

육안으로 식별가능한 외관을 갖는 물질을 제공하는 방법들이 많이 공지되어 있다. 일반적으로 육안으로 식별가능한 외관은 직접 물질에 제공되거나 또는 물질이 관련된 물품, 애컨대, 표지, 포장지 또는 용기에 제공된다. 육안으로 식별가능한 외관은 애컨대, 식별가능한 형상 또는 구조, 식별가능한 마킹 또는 이들의 조합일 수 있다. 특히 바람직한 육안으로 식별가능한 외관은 상표이다.

모조품의 물질은 진품의 물질과 동일하거나 다를 수 있다. 흔히 모조품의 물질은 동일하나, 품질이 떨어진다.

모조품을 제조할 수 있는 여러 가지 방법들이 있다. 한 방법에서, 제품 위조자들은 진품의 외관을 모방하여 육안으로 식별가능한 외관을 갖는 모조 물질을 제공한다. 또 다른 방법으로, 제품 위조자들은 진품의 물질이 갖는 육안으로 식별가능한 외관에는 아무런 영향을 미침이 없이 진품의 물질의 질을 저하시키거나 대체시킨다.

그러한 문제점의 한 예는 위조자의 기체를 진품에 첨가함으로써 유혈유 또는 기체를 기제로한 다른 제품의 질을 저하시키는 것이다. 그러한 질의 저하는 오일 제조업자에게 재정적으로 손해를 줄뿐만 아니라, 성능을 저하시켜서 소비자에게 해를 끼치고 결과적으로 진품의 평판을 좋지 않게 한다.

이러한 문제점을 극복하는 방법으로는, 제품에 염료를 포함시키는 것이 이전에 제안되어졌다. 그러나, 그

러한 전락은 쉽게 모방된다. 그러나 육안으로 쉽게 검출되지 않는 마커를 포함시키면, 질이 저하된 정도(존재한다)를 결정하기 전에 질이 저하되었는지 모르는 제품의 샘플에 물리적 분석을 위한 기초 실험, 예컨대, 크로마토그래피를 행할 필요가 있다. 결과적인 지체는 예컨대, 백-업(back-up) 실험실 편의를 쉽게 이용할 수 없는 필드의 배급자에게 있어서 편리하지 못하고 모조품을 방지하는 기술의 효과를 낮춘다.

모조품을 검출하려는 시도에 대한 이 분야에서 사용할 수 있는 방법이 분명히 필요하다.

유럽 특허 출원 공개 번호 EP-A-0260829에는 물질 내에서 염소화된 페놀, 특히 펜타클로로페놀을 동정하고 이 물질 내에서 삼기 화학제의 농도를 측정하기 위해 사용될 수 있는 모노클론 및 폴리클론 항체가 기술되어 있다. 명세서 서론부분에 펜타클로로페놀이 살충제 또는 방부제로서 물질에 첨가된다는 것이 기록되어 있다. 그러나, EP-A-0260829에는 제품, 즉, 육안으로 식별가능한 외관을 가진 물질 내에서 염소화된 페놀을 동정하는 것이 기술되어 있지 않다. 더욱이 EP-A-0260829에는 마커 화합물로서 염소화된 페놀을 사용하는 것이 기술되어 있지 않다. 특히 EP-A-0260829에는 모조품으로부터 진품을 구별하기 위해 진품과 염소화된 페놀을 결합시킬 것을 기술하고 있지 않다.

피레트로이드 살충제의 면역분석법의 개발이라는 제목으로 캐나다 오타와시에서 1986년 8월 10-15일에 열린 살충제 화학 제 6차 국제회의에서 M. J. 우레이스 일행은 광고 발표문에 디클로로비닐 시클로프로판 카르복실산 및 m-페녹시벤조산의 단백질의 결합체(conjugate) 및 이 단백질 결합체들을 사용하여 제조된 폴리클론 항체들을 기술하였다. 또한 홍차, 물 및 토양에서 사이퍼메트린 대사물, m-페녹시벤조산 및 디클로로비닐 시클로프로판 카르복실산의 분석도 기술하였다. 그러나 마커 화합물로서 m-페녹시벤조산 또는 디클로로비닐 시클로프로판 카르복실산을 사용하는 것과 육안으로 식별가능한 외관을 갖는 어떤 물질내에서 이 둘 중 어떤 화합물을 면역분석에 의해 검출할 것은 전혀 기술되어 있지 않다.

본 발명에 따라서, 수성 매체 내에서 마커 화합물의 샘플을 제공하고 이 마커 화합물에 특이적인 면역분석에 의해서 샘플 내에서 마커 화합물을 동정하는 것으로 이루어진, 육안으로는 검출할 수 없으며 본질적으로 수용성인, 제품에 결합된 마커 화합물의 존재를 검출하는 방법을 제공한다.

마커 화합물은 매우 다양한 방법으로 제품과 결합될 수 있는 것으로 이해된다. 따라서, 마커 화합물은 제품의 일부 또는 전체, 제품과 관련된 용기, 포장 또는 표지의 일부 또는 전체에 존재할 수 있다. 마커 화합물은 보통 제품과 혼합된다. 대안적으로는, 제품과 독립적으로 존재할 수도 있다. 예를 들면, 마커는 제품 포장 또는 표지에 존재할 수 있다.

제품은 고체이거나 유체일 수 있다.

고체 제품의 예에는 제약학적 정제, 캡슐 및 분말; 살충제, 제초제, 살진균제 및 비료같은 농화학제의 고형 배합물; 옷감과 같은 직물; 카세트 테이프, 플로피 디스크, 콤팩트 디스크 및 축음기 레코드와 같은 기록용품; 텔레비전 세트 컴퓨터 및 라디오와 같은 전기 제품; 자동차항 성분 및 카메라가 있다.

유체 생산품의 예에는 윤활유, 가솔린, 디젤 및 액화 석유 제품과 같은 기름을 기재로한 제품; 의료: 항료; 화장품; 포도주, 위스키, 세리, 진 및 보드카와 같은 음료; 시럽, 유착액 및 현탁액과 같은 액체의 제약 배합물; 액체의 농화학 배합물; 및 공업 용제가 있다. 제품은 바람직하게는 액체, 바람직하게는 윤활유와 같은 기름을 기재로 한 제품이다.

마커 화합물은 육안으로는 검출할 수 없으며 본질적으로 수용성이여야 한다. 마커 화합물은 면역분석에 의해 검출될 수 있어야 하며 또한 그것이 마킹하는 제품과 양립될 수 있어야 한다는 것으로 이해된다. 면역분석 기술분야의 당업자는 마커 화합물로 사용하기에 적합한 화합물들을 동정하는 데 어려움이 없을 것이다.

마커 화합물로 사용하기에 적합한 유용한 화합물은 탄소원자, 수소원자, 및 산소와 질소로부터 선택된 하나 이상의 헤테로원자를 함유하는 유기 화합물 및 그의 염일 것이다. 염의로 하나 또는 그 이상의 헤테로원자로는 예를 들면, 염소, 브롬 또는 요오드 원자와 같은 할로겐 원자, 인 원자, 황 원자라도 존재할 수 있다. 바람직한 화합물들은 카르복실산, 카르복실산 에스테르, 케톤, 알코올, 페놀, 아민, 아비린, 니트릴 및 에테르 및 그의 염들이 있다. 특히 바람직한 화합물들은 방향족 카르복실산, 예컨대, 벤조산; 페놀; 다가 알코올 및 페놀의 에테르; 아미노산; 펩티드; 단백질; 지질; 탄수화물, 예컨대, 당 및 다당류; 핵산; 및 폴리핵산, 예를들면 데옥시리보핵산 및 리보핵산이 있다.

제품이 윤활유와 같은 기름을 기재로한 제품일 때, 마커 화합물로 사용되는 화합물은 바람직하게는 log P가 -2.5 내지 +5.0, 바람직하게는 -1.5 내지 4.5, 가장 바람직하게는 0 내지 4.0 범위이다(본원에서 사용된 log P는 25°C에서 옥탄올과 물 사이의 화합물의 분배계수의 대수이다). 따라서, m-페녹시벤조산은 예를들면, log P가 3.9이다.

광학적으로 활성 형태의 특정 화합물에 대해 선택적인 항체들을 생산하는 것이 가능하다. 통상적인 분석 기술에 의해서는 광학적으로 활성 형태들의 화합물들을 구별하기가 어렵기 때문에(특히, 단지 미량의 화합물만이 분석에 이용될 때), 광학적으로 활성인 마커 화합물들을 사용하는 것이 특히 이롭다.

마커 화합물로 사용하기에 적합한 화합물이 m-페녹시벤조산으로 밝혀졌으나, 마킹해야 할 제품에 해가 되지 않고 함께 혼합될 수 있는 한 다양한 화합물들이 상기 목적에 적합하다는 것으로 이해된다. 따라서, 마킹해야 할 제품에 따라서, 기름-혼화성, 수-혼화성 및 고체-혼화성 화합물들을 마커 화합물로서 사용해야 한다.

제품이 액체일 때, 마커 화합물은 바람직하게는 무색이고 액체 제품에 용해되어 그의 존재가 이후의 분석에 의해서만 검출될 수 있어야 한다. 이는 또한 바람직하게는 냄새가 없어야 한다.

바람직하게는 단지 미량의 마커가 사용된다. 전형적으로 마커 화합물은 1 ppb(part per billion) 내지 25 ppm(part per million) 범위의 농도로 제품과 혼합될 것이다. 바람직하게는, 농도가 100 ppb 내지 15 ppm이고 더욱 바람직하게는, 1 ppm 내지 10 ppm일 것이다. 따라서 예를 들면, 마커 화합물의 농도는 약 10 ppm까지이며 마커 화합물에 따라 소량의 ppb도 검출하기에 충분할 수 있다.

25 ppm 또는 그 이하의 마커 화합물 농도를 검출하는 능력은 본 발명에 따른 방법의 특별한 잇점이다. 따라서 단지 소량의 마커 화합물만을 사용할 필요가 있다.

또 다른 특징에 따라, 본 발명은 -2.5 내지 5.0 범위의 log P를 갖는 육안으로 검출되지 않으며 본질적으로 수용성인 마커 화합물을 1 ppb 내지 25 ppm을 함유한 기름을 기재로한 제품을 제공한다.

마커 화합물이 수성 매체에서 제품과 혼합되면, 면역분석은 그 샘플에 직접 행할 수 있고 필요에 따라, 고형물을 제거하기 위해 여과시킨 후 행할 수 있다. 그렇지 않으면 마커 화합물을 수성 용액에 녹여야 한다.

일반적으로, 수성 용액 내에 마커 화합물 샘플을 제공하는 것은 제품으로부터 마커 화합물의 용매 추출; 제품의 수성 용매로의 희석; 여과; 증발; 및 마커 화합물의 고체상 추출, 에컨대, 이온교환 수지 또는 크로마토그래피(에컨대, 실리카를 사용하여) 중에서 선택된 하나 또는 그 이상의 단계들을 포함할 것이다. 마킹된 기름-기재 제품의 경우는, 용매 추출이 필요하다.

분석에 앞서 제품로부터 마커 화합물을 추출하기 위해 선택된 용제는 자연적으로 제품 및 마커의 특징에 의존한다. 제품 및 마커의 특성에 따라, 용제는 일반적으로 물; 탄화수소, 에컨대, 벤젠, 톨루엔, 크실렌, 헥산, 헵탄 및 옥탄; 알콜사이드, 에컨대, 디메틸알콜사이드; 할로겐화된 탄화수소; 에컨대 클로로벤젠, 염화메틸렌, 클로로포름 및 사염화탄소; 에테르, 에컨대, 디에틸 에테르, 디옥산 및 테트라하이드로퓨란; 아미드, 에컨대, 디메틸포름아미드 및 디메틸아세트아미드; 니트릴, 에컨대 아세토니트릴; 알코올, 에컨대, 메탄올, 에탄올 및 프로판올; 에스테르, 에컨대, 에틸 아세테이트; 및 케톤 에컨대, 아세톤 중 하나 또는 그 이상을 포함할 것이다. 바람직하게는 용제는 물 및/또는 수-혼화성 유기 용제를 포함한다. 시험 윤활유가 m-페녹시벤조산으로 마킹되면, 적당한 추출 용제는 헥산과 같은 기름용 희석제, 아세토니트릴과 같은 수-혼화성 유기 용제 및 물의 혼합물이다. 임의로 추출 용제는 트리소 완충제(트리소[히드록시메틸]아미노메탄)과 같은 완충염도 포함된다. 사용된 용제 시스템은 이후의 면역 분석을 위해 직접적으로 적당한 수성상 내에서 추출된 마커 화합물을 바람직하게 생산한다.

면역분석은 선택된 마커 화합물에 대하여 미리-제조된 항체를 사용하여 수행한다. 이러한 항체는 특별한 화합물에 대해 특이한 모노클론 또는 폴리클론 항체를 수득케하는 공지 기술에 의해 만들어진다. 바람직하게는, 모노클론 항체가 사용된다.

항체는, 동물을 의해 화합물(항원)에 노출시켰을 때 반응하는 B-림포사이트로서 알려진 항체-생성 세포에 의해 동물에서 생성된 단백질이다. 이들 항체는 이들의 생성을 자극하는 특별한 화합물에 특이하게 결합된다.

동물이 면역원 화합물로 면역되었을 때 동물의 비장에서는 항체-생성세포를 만든다. 모든 화합물이 면역원이 되는 것은 아니다. 일반적으로, 2,000 이하의 분자량을 갖는 화합물은 면역원이 아니다. 그렇지만, 탄수화물 또는 단백질과 같은 보다 큰 면역원 당체에 항원을 화학적으로 결합시키고 그 결과 형성된 면역원 결합체로 동물을 면역시킬 때에 상기 화합물에 특이한 항체(항원으로 알려짐)도 얻을 수 있다.

2-단계 화학 반응에서 이관능성(bifunctional) 분자를 사용하여 면역원 당체를 항원에 부착시킬 수 있다. 이것은 면역 반응을 개선할 수 있는 당체 및 항원 사이에 스페이서 아암(spacer arm)을 제공한다. 화합물이 당체 또는 이관능성 분자에 화학적으로 결합되기 위해서, 이것은 그 자체가 관능성기를 함유해야 한다. 바람직한 관능성기는 아미노기, 히드록실기 및 카르복실기이다.

동물이 면역원 물질로 면역될 때 매우 다양한 상이한 항체-생성 세포들이 자극된다. 이러한 반응에 의해 생성된 항체는 폴리클론 항체로서 공지되어 있다.

특정한 화합물에 대하여 만들어진 폴리클론 항체는 동일한 특이성으로 그 화합물에 모두 결합되지 않는다. 그렇지만, 화합물에 대해 동일한 특이성 및 친화도로 모두 결합되는 항체를 얻을 수 있다. 이들 항체는 모노클론 항체로서 알려져 있다.

이러한 모노클론 항체를 얻기 위해서, 항체-생성 세포를 면역화된 동물의 비장에서부터 먼저 추출한다. 이들 세포는 골수종 세포와 융합되어 하이브리도마(hybridoma)를 생성한다. 에컨대, 폴리 에틸렌 글리콜로 처리하여 융합시킬 수 있다. 하이브리도마는 전구체 항체-생성 세포와 같은 항체를 생성할 수 있으나 죽지 않으며; 실험실에서 연속 성장할 수 있다. 항체 생성세포와 융합하기에 적당한 다수의 골수종 세포는 공지되어 있으며 당 업자가 쉽게 구입할 수 있다. 쉽게 구입할 수 있는 적당한 골수종 세포의 예로는 PX3-63-A68-6530이 있다. 이 세포는, 에컨대, ATCC CRL 1580번으로 미합중국, 메릴랜드주 로크빌에서 에머리언 타입 컬처 콜렉션으로부터 구입가능하다.

항체-생성 세포와 골수종 세포가 융합되었을 때, 결과 형성된 하이브리도마 세포를 융합되지 않은 세포로부터 분리하고, 반복되는 제한 희석으로 클로닝한다. 클로닝된 하이브리도마를 시험하여 원하는 항체를 생성하는지를 결정한다. 이 시험은, 에컨대, 경쟁적 효소-결합 면역흡착 분석(ELISA)에 의해 수행될 수 있다. 고정상에 결합되는 화합물의 모노클론 항체의 결합을 저해하는 유리 화합물의 능력을 평가하기 위한 ELISA 시험 시스템에 유리 화합물을 첨가하여 화합물에 대한 특이성 및 친화도를 평가할 수 있다.

특별한 하이브리도마가 선택되었을 때, 주지된 기술을 사용하여 모노클론 항체를 많은 양으로 쉽게 생성할 수 있다. 원한다면, 이들 항체를 양고추냉이(horse radish) 퍼옥시다제 또는 알카리성 포스포타제와 같은 효소로 라벨화시킬 수도 있다.

화합물에 대한 모노클론 항체 및 폴리클론 항체를 생성하는 기술이 당업자에게 공지되어 있다. 이러한 기술이 설명된 참고문헌으로는, 코홀러, 지아, 및 밀스테인, 씨이, 네이처, Vol 265, P 495(1975)와 아카데미 프레스 1980(부분A) 및 1981(부분B)에 의해 발간되고 판 부니키스, 에이치 및 탄곤, 제이. 엘.에 의해 각각 편집된 효소학의 방법 Vol 70 및 Vol 73 면역화학 기술 부분 A 및 B를 포함한다.

다른 특징으로, 본 발명은 m-페녹시벤조산에 대한 신규한 모노클론 항체를 포함한다.

본 발명에 따른 방법은 샘플 내에 마커 화합물을 정량적으로 또는 정성적으로 동정하는 것을 포함할 수 있

다. 이 방법은 바람직하게는 마커 화합물을 정량적으로 동정하는 것을 포함한다. 이 방법에서, 질이 저하된 정도를 확인할 수 있다.

항체와의 접촉에 의한 마커 화합물의 분석은 효소-매개 면역분석 및 샌드위치 면역측정 분석을 포함하는 다른 면역분석법이 사용될 수 있으나, 경쟁적 효소-결합 면역흡착 분석(ELISA)에 의해 바람직하게 수행된다. 분석 결과의 실제적인 검출은 비색 수단 또는 화학발광 또는 형광과 같은 대체 검출 수단에 의해 행할 수 있다.

그러한 검출 방법은 복잡한 실험 장비가 필요하지 않기 때문에 필드 조작에 매우 적합하다. 따라서 본 발명의 또 다른 특징에 따라, 수성 매체내에 상기 마커 샘플을 제공하는 수단, 마커 화합물에 특이적인 항체를 포함하는 면역분석 수단, 면역분석을 탐지하는 검출 수단 및 진품에 대해 예상되는 결과와 면역분석 결과를 비교하는 수단을 포함하는, 육안으로 검출할 수 없으며 본질적으로 수용성인, 제품에 결합된 마커 화합물의 존재를 검출하기 위한 분석 키트가 제공된다.

수성 매체 내에 상기 마커의 샘플을 제공하기 위한 수단은 마커를 수성 용액으로 하는데 필요한 임의의 용제 및/또는 불필요한 고형물을 제거하기 위한 여과 수단 및/또는 고체 상 추출 칼럼(예를 들면, 이온 교환 수지를 함유하는 칼럼 또는 실리카와 같은 크로마토그래피 매체)을 포함할 수 있다.

면역분석 수단은 적당량 공급된 모노클론 또는 폴리클론 항체를 포함할 수 있다. 이는 또한 고체상에 결합될 수 있는 합텐도 함유할 수 있다.

면역분석 결과를 탐지하기 위한 검출 수단은 예를 들면, 비색 반응을 생산하고/하거나 측정하기 위한 수단일 수 있다. 따라서 검출 수단은 효소와 효소의 기질을 함유할 수 있다. 효소는 합텐, 항-합텐 항체, 또는 항-합텐 항체에 대항하는 2차 항체에 부착될 수 있다. 효소의 예에는 알코올이 퍼옥시다제 및 알카리성 포스파타제가 있다. 기질의 예에는 o-페닐렌디아민 디하이드로클로라이드; 아머라이트 시그널 시약(Amerlite Signal Reagent, 아머삼 인터내셔널 PLC로부터 구입가능); 및 p-니트로페놀 포스페이트가 있다. 형광계의 광도계, 분광광도계와 같은 외부 검출장치가 사용될 수 있다. 이 방법에서는, 마커 화합물의 존재뿐만 아니라 존재하는 양도 측정할 수 있어서, 제품의 질이 저하된 정도를 나타낼 수 있다.

진품에 대해 기대되는 결과와 면역분석 결과를 비교하기-위한 수단은 진품에 대해 기대되는 결과를 나타내는 지시물(예를 들면, 색상 차트, 구경 테이블 또는 구경 곡선을 포함함)을 포함할 수 있고 또는 마킹된 진품과 동일한 마킹된 물질 샘플(알려지지 않은 샘플에 대해 분석될 것임)을 포함할 수 있다.

키트에는 바람직하게는 진품의 물질에 제공된 육안으로 식별할 수 있는 외관에 대한 설명이 제공된다. 예를 들면, 키트는 진품 물질의 상표에 대한 설명이 제공될 수 있다.

키트 내의 분석 수단 제공 능력은 제품원과 거리가 먼 환경의 제품 배급자와 같은 필드의 사람이 제품을 옮기는 과정없이 곧 검사해볼 수 있게 한다.

본 발명은 다음 실시예들을 참고로하여 더 설명될 것이다.

#### [실시예 1]

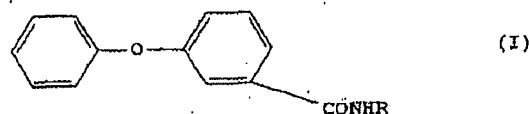
[마커(marker) 화합물로서 이용하기 위해 고안된 화합물의 단백질 결합체 제조]

m-페녹시벤조산(합텐, 이후에 'PBA'로 언급)의 일련의 단백질 결합체를, 먼저 화학 합성에 의해 PBA로부터 적당한 반응 유도체를 제조한 다음, 단백질과 유도체를 결합시켜서 제조한다. <sup>14</sup>C 방사성 라벨을 갖는 유도체를 제조함으로써 이후의 단백질 결합체를 탐지하고, 시약의 제거를 점검하고 합텐을 갖는 단백질의 부위를 계산한다.

#### 1) PBA 유도체의 제조

m-페녹시벤조산을 벤젠 내에서 염화 티오닐과 반응시켜서 상응하는 염화벤조일을 수득하여, 수산화나트륨 존재 하에 4-아미노부티르산과 연속적으로 반응시킨 다음, 산 가수 분해함으로써 하기 일반식(1)의 유도체 a)를 수득한다:

#### 화학식 1



상기식에서 R은  $-(CH_2)_3COOH$ 이다.

중간체의 염화벤조일과 b) 글리신 및 c) 글리실 글리신을 수산화 나트륨 존재 하에 반응시키고나서, 산 가수 분해하여, b) ROH  $-CH_2COOH$ 인 일반식 1의 유도체 및 c) ROH  $-CH_2CONHCH_2COOH$ 인 일반식 1의 유도체의 두 개의 상이한 유도체를 수득한다.

수성 테트라히드로푸란 내에서 벤질 4-아미노부티레이트 및 3-(3'-디메틸아미노프로필)-1-에틸 카르보디이미드를 반응시켜서 ROH  $-(CH_2)_3COOCH_2Ph$ 인 일반식 1의 화합물을 수득하고 이어서 테트라히드로푸란 내에서

목탄삼팔라디움 촉매로 수소 첨가 분해하여 일반식 1의 유도체 a)를 제조할 수 있다.

유도체를, 균일한 용액이 얻어질 때까지 첨가되는 테트라히드로푸란 및 물 내에 탄산나트륨 또는 중탄산나트륨을 화학양론적 양으로 첨가하고 증발건조시킴에 의해 이의 나트륨 염(물에서 쉽게 용해)으로 전환시킨다.

#### ii) 단백질 결합체의 제조

이의 나트륨염의 형태로 상기 i)에서 기술한 바와 같이 제조된 유도체를 각각 물에 용해시키고 pH 8로 조절하고, 0°C로 냉각한다. 또한 0°C로 냉각된 3-(3'-디메틸아미노프로필)-1-에틸 카르보디이미드의 용액을 유도체 나트륨염에 첨가하고 이소우레아 카르복실레이트가 완전히 형성되는 2분 동안 정치시키도록 한다.

각각의 유도체를 증류된 탈이온수(水)에 용해시키고 여과시킨 하기 단백질 중 하나에 결합시킨다:

소 혈청 알부민 (분자량 약 68,000)

닭 감마 글로불린 (분자량 125,000-750,000)

키홀 림페트 해모시아닌 (분자량 3,000,000-7,000,000)

용액을 취하여 섞으면서 단백질에 첨가하여 부하를 수행하고 결합을 완결시키는 수시간 동안 5°C에서 혼합물을 유지시킨다. 필요하면 pH 8로 조정한다. 부하된 단백질을 매일 투석액을 변화시키면서 5 내지 7일 동안 pH 7.3의 염수 인산염 완충 용액으로 투석시키고, 부하를  $^{14}\text{C}$  방사능 측정에 의해 결정한다.

#### [실시예 2]

##### [모노클론(monoclonal)항체의 생성]

PBA 및 소 혈청 알부민의 결합체(15 몰 PBA/단백질의 몰)를 사용하여 항체를 생성한다. PBA-소혈청 알부민을 실시예 1 ii)의 절차로 실시예 1 i)의 유도체 a)를 사용하여 제조한다.

6 마리 쥐들(Balb/c, 암컷)을 PBA 결합체(0.1 ml, 50 µg)와 프루인드 완전 애주번트(Freund's complete adjuvant)의 1:1 유액으로 피하를 통해 면역시킨다. 각 동물은 불완전 애주번트와 함께 3주 간격으로 3회 주사를 받는다. 유사한 양생법으로, 또 다른 6마리 동물은 보다 높은 투여량의 결합체(200 µg)를 받아 들인다. 12마리 동물로부터 얻은 혈청 샘플을 효소-결합 면역 흡착 분석(ELISA)에 의해 PBA에 대한 특이 결합을 시험한다.

가장 높은 혈청 농도로 항체를 생산하는 동물로부터 비장을 제거하고, 비세포(脾細胞)는 PX3-63-AG8-653 골수종세포(미합중종 메탈랜드주 로크빌레시 아메리칸타입 컬처 콜렉션으로부터 ATCC CRL 1580으로 구입가능하다)와의 용합에 사용된다. 하이브리도마(hybridoma) 세포를 96-웰(well) 미세적정 판에 분배시킨다. 세포 성장에 이어서, 상등액 조직 배양 유동물을 ELISA에 의하여 항체 생성 여부에 대해 시험한다. ELISA 방법에서 고형상 PBA 표적에 대한 항체 결합의 저해를 측정하기 위하여 유리 PBA를 시험 시스템에 첨가함으로써 특이성을 평가할 수 있다. 여러 양성 웰로부터 세포를 성장시켜 세포 저장물을 생성한 후 제한 희석 기술로 클로닝한다. 또한 세포성장기에 이어서, 결과 형성된 상등액을 상기한 바와 같이 시험하고, 여러 양성웰의 내용물을 성장시키고, 다시 클로닝한다. 두 번째 클로닝에 이어서 양성으로 확인된 웰 내의 세포를 예비 분석 전개를 위한 충분한 모노클론 항체를 함유하는 상등액을 생성시키도록 성장시킨다.

중간-기간 요구에 대한 충분한 모노클론 항체를 생성하기 위해, 5개의 클론 세포 하이브리도마를 항체-중부 복수(腹水)액의 생성을 위해 선택한다. 하이브리도마 당 프리스탄-처리(pristane-primed)된 열 마리 암컷 쥐(Balb/c)를 하이브리도마 세포  $10^7$  어하로 복강 내에 접종한다. 복수액을 수확하고, 한데 모으고 심하게 동결 저장한다.

항체를 실험실 내 취하여 섞은 조직 배양 용기 내에서 하이브리도마 세포를 성장시켜서 제조한다.

클론 세포 하이브리도마 중 하나의 샘플을 수탁 번호 B901101로 1989년 1월 10일에 영국, 살리스버리 SP4 0JG, 포르톤 다음에 소재한, 응용 미생물 및 연구를 위한 PHLS 센터, 동물 세포 배양의 유럽 콜렉션(ECACC)에 기탁했다.

#### [실시예 3]

##### [마킹된 윤활유의 분석]

m-페녹시벤조산 10 ppm을 함유하는 마킹된 윤활유(셀 상표면 리몰라 X(Rimular X)로 구입가능)를 제조한다. 다양한 백분율(%)로 마킹된 오일 및 미오일 오일을 함유하는 일련의 샘플 2ml를 제조한다.

하기 방법에 의해, PBA를 각 오일로부터 분석을 위해 추출한다.

##### [오일로부터 PBA의 추출]

1. 진동 점검이 수행될, 오일 샘플을 밀봉 가능한 용기에 둔다. 0.05M 트리스/HCl (pH 7.5)내의 20% 아세토니트릴(1 부피) 및 핵산(5부피)을 오일에 첨가한 후 용기를 밀봉한다. 혼합물을 1분 동안 흔들고 결과 형성된 현탁액을 분리하도록 한다. 이것은 약 30초가 소요된다.

2. 분취량은 1회용 플라스틱 피펫을 사용하여 분리된 혼합물의 보다 낮은 상으로부터 취해서 3ml의  $\text{NH}_3$  본드 엘루트(Bond Elut)컬럼(존스 크로마토그래피로부터 얻어진 이온 교환 수지 컬럼)에 적용시킨다. 추출 샘플에 압력을 가하여 컬럼을 통과시키고 컬럼을 증류수의 4 x 1ml의 분취량으로 세척한다.

3. 컬럼을 염수 내 트윈(Tween) 20 0.05 부피%의 용액 2ml로 용출시킨다. 이 용액은 임의 결합된 PBA를 제거한다. 각각의 회수된 PBA 용액을 하기 방법에 의해 경쟁적 효소-결합 면역흡착 분석(ELISA)에 적용시킨다.

[면역 분석 방법(비색법으로 검출)]

1. 플라스틱 웰/튜브를 실시예 1에서 기술된 바와 같이 제조된 PBA-닭 감마 글로불린 결합체의 고정된 수준으로 코팅 처리한다. 이 코팅을 수행하기 위해, 10  $\mu$ g 농도의 100ul 결합체의 측정된 부분 표본을 웰/튜브 내에 둔다. 이를 조심스럽게 조절된 온도에서 고정된 시간동안 배양하고 재생성 가능한 수준의 코팅을 흡착에 의해 수행한다. 코팅 시기 후, 웰을 세척하고 4°C로 저장할 수 있다.
2. 분석될 PBA-항원 용액을 실시예 2에서 기술된 바와 같이 제조된 제한 수준의 특이 모노클론 항체의 존재하에 예비-코팅처리된 웰 내에 둔다. 항체의 샘플을 1:1000로 희석하여 사용한다. 분석의 기본은 결합체로서 웰의 표면상에서 부동성인 PBA 및 용액 내 PBA 사이의 이 항체의 결합에 대한 경쟁이다. 고정된 기간 후, 웰 내 용액을 제거하고 웰을 세척한다. 세척 후, 웰 내에 남아 있는 항체는 부동화 PBA에 결합되므로, 남아있는 항체의 수준은 유리 용액 내에 앞서 존재하는 PBA의 수준에 반비례한다.
3. 두 번째 항체-효소 결합체의 용액을 웰에 첨가한다. 사용된 두 번째 항체 효소 결합체는 100ul/웰의, 1:1000 희석된 IgG(1CN 바이오로지컬스로부터 구입가능한 토끼 항-쥐 면역 글로불린 G에 결합된 알카리성 포스파타제(phosphatase))이다. 이 결합체는 남아서 웰 내 부동화 결합체에 결합된 임의의 첫 번째 항체에 결합한다. 두 번째 항체-효소 결합체를 과량으로 첨가하고, 다시, 결합되지 않은 물질을 세척하여 제거한다. 세척 후, 웰 내에 남아있는 두 번째-항체-효소 결합체의 수준은 상기 단계 2에서 결합된 첫 번째 항체 수준에 정비례한다.
4. 두 번째 항체-효소 결합체의 효소에 대한 기질을 함유하는 용액을 웰에 첨가하고, 존재하는 효소의 수준을 착색된 생성물 형성을 측정하여 결정한다. 기질은 10% 디에탄올아민 완충제(pH 9.8 1mg/ml의 p-니트로페닐 포스페이트 아니트륨 염(시그마 케미칼사로부터 시그마 104 포스파타제 기질로서 구입 가능)이다. 황색으로 착색된 생성물의 형성을 수직 비임 가시광선 흡수 분광 분석기(MR 610, 마이크로플레이트 리더-다이나테크)를 사용하여 405nm에서 측정한다. 다양한 백분율의 마킹된 오일을 함유하는 오일 샘플의 비색 분석 결과의 두 세트를 하기 표 1에 제공한다.

결과를 샘플 내 마킹된 오일의 백분율로써 설명한다.

[표 1]

샘플번호	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
계산치	75	25	100	0	50	0	33	100	10	50
세트A 판독치	47	14	100	0	50	0	29	100	0	42
세트B 판독치	76	33	93	0	55	0	22	118	31	55

[실시예 4]

[분석 키트의 조립 및 마킹된 윤활유의 분석에 있어서 분석 키트의 사용]

3개 이하의 윤활유 모조 샘플에 시험하기에 적당한 분석키트를 조립한다. 키트는 하기(1)-(11)을 포함한다:

- (1) PBA-닭 감마 글로불린 결합체로 코팅시킨 5개의 플라스틱 튜브(하기한 바와 같이 제조함);
- (2) 5개의 이온 교환 수지 컬럼, (존스 크로마토그래피로부터 얻어진 3ml의 NH 본드 엘루트(Bond Elut)컬럼);
- (3) 0.05M 트리스/HCl (pH 7.5)내 40% 아세트니트릴 2m, 및 핵산 8ml로 이루어진 10ml 부피의 추출 용매 5개;
- (4) 10 ppm의 m-페녹시벤조산을 함유하는 윤활유 샘플 1개(마킹된 진품의 샘플을 나타냄);
- (5) m-페녹시벤조산을 함유하지 않은 윤활유 샘플 1개;
- (6) 0.05% w/w 트윈 20(폴리옥시에틸렌-솔비탄 모노라우레이트, 시그마 케미칼 캄파니로부터 구입 가능, 카탈로그 번호 P1379)을 함유하는 인산염 완충염수로 10배 희석시킨 2ml 부피의 PBA-특이적 모노클론 항체 5개(PBS, 옥소이드로부터 정제 형태로 구입가능);
- (7) 1부피의 항체-효소 결합체 (DAKO 리미티드로부터 구입가능, 카탈로그 번호 P161, 생쥐 면역 글로불린 내지 토끼 면역 글로불린과 결합한 양고추냉이 퍼옥시다제(peroxidase)를 포함함);
- (8) 화학발광 기질(아메트라이트 시그널 시약, 아메르삼 인터내셔널 PLC로부터 구입 가능, 카탈로그 번호 LAN 4400);
- (9) 염수 내 0.05% (v/v) 트윈 20(ST)로 이루어진 세액;
- (10) 증류수로 이루어진 컬럼 세제; 및
- (11) 지시 시이트 1개

[PBA-닭 감마 글로불린 결합체로 코팅시킨 플라스틱 튜브의 제조]

실시에 1에 기술된 바와 같이 제조된 고정된 수준의 PBA-담 감마 글로불린 결합체로 플라스틱 튜브를 코팅시킨다. 코팅을 수행하기 위해, 20 µg/ml의 농도로, 500µl 결합체의 측정된 분취량을 튜브에 넣는다. 이후, 실온에서 3시간 동안 배양하고 흡착에 의해 코팅의 재생산성 수준을 얻는다. 코팅 시킨 후, 실시예 3에 기술된 염수/트윈 용액(ST)로 튜브를 세척하고, 건조시키고 바람직하게 4°C에서, 필요할 때까지 건조기 내에 저장한다.

[마킹된 유효유 분석에 있어서 분석 키트의 사용]

1. 분석을 수행하기 위해서, 첫 번째 단계에서 제조자의 지시에 따라 화학 발광 기질을 제조한다.
2. 실시예 3의 방법에 따라, 5 부피의 추출 용매 및 5개의 이온 교환 컬럼을 사용하여 유효유의 알려지지 않은 3개의 샘플과 키트에 속한 유효유의 두 개의 샘플을 추출한다. 이후 컬럼을 2개의 컬럼 2ml 분취량으로 세척한다.
3. 컬럼 각각을 2ml 부피의 PBA-특이적 모노클론 항체를 함유하는 작은 유리병 내로 2ml 분취량의 세액으로 용출시킨다.
4. 병의 내용물을 혼합한 후, 5 혼합물 각각으로부터 적어도 500µl를 PBA-담 감마 글로불린 결합체로 코팅시킨 5개의 플라스틱 튜브에 이송한다. 5분 후 튜브 내 용액을 따라내고 튜브를 세액으로 한번 세척한다.
5. 항체-효소 결합체 용액 500µl를 튜브 각각에 첨가한다. 5분 동안 배양시킨 후 튜브의 내용물을 따라내고 튜브를 세액으로 다섯 번 세척한다.
6. 화학 발광 기질(1ml)을 튜브에 첨가하고 2분 후 휴대용 발광기를 장치한 튜브 광도계(디노테크 라보레 이토리 리미터드로부터 구입 가능)의 사용을 위해 제조자의 지시에 따라 광출력을 측정한다. 지시의 독출은 0- 네지 999 범위 내 3 디지털 수이다.
7. 4주 동안, 두가지 작동에 의해 수행된, 일련의 35 분석에 대해 방법의 재생산성을 평가한다. 일련의 실험에 대한 편차의 중간 분석율(CV)은 9.1%이다. 분석을 정확하게 수행하는 경우, 포지티브 대조용(보다 낮은 독출): 네가티브 대조용(보다 높은 독출)의 비율이  $0.612 \pm 0.056$ (즉,  $\pm 1$  표준편차(SD))인 것으로 밝혀졌다. 알려지지 않은 오일에 대한 0.725 이상의 값은 가능한 모조 샘플을 나타낸다.

[실시예 5]

[마킹된 가솔린의 분석]

가연(加鉛) 가솔린 및 비가연 가솔린의 13ml 샘플을 3가지 수준의 PBA(10.5 및 2.5 ppm)로 마킹한다. 이들을 트리스 완충액(2ml, 0.05M, pH 7.5)으로 추출한다. 실시예 3에 기술된 바와 같이 추출물을 분석하고 마킹되지 않은 가솔린 추출물로 제조된 표준 교정곡선을 사용하여 PBA 양을 잰다. 측정되는 추출 효율을 가능케하고 측정치와 이론치 사이의 비교를 허용하도록 방사라벨링된 PBA를 함유하는 상응하는 샘플들을 제조한다. 결과를 표 2에 나타내었다.

[표 2]

마킹되지 않은 가솔린 추출물의 교정 곡선에 대해

분석한 수성 샘플들에 대한 이론치 및 측정치의 비교

샘플	희석된 10 ppm 추출물				희석된 5 ppm 추출물			
	대조용	추출물	1:2	1:4	1:8	추출물	1:2	1:4
가연 가솔린								
이론치(방사화학)	0	46*	23	11.5	5.7	23	11.4	5.7
측정치	0.9	47	22.5	11.0	6.4	29	13.5	5.3
비가연 가솔린								
이론치(방사화학)	0	33	16.2	8.1	4.1	15.5	7.7	3.9
측정치	0.9	41	18.5	7.0	3.8	14.5	6.2	3.4

\* 모든 값은 ppm으로 한다.

이들 결과는 13ml의 가솔린으로부터 2ml의 트리스 완충액 내로 PBA를 추출함으로써 얻어진 농도 효과를 설명하며, 면역 분석으로 PBA로 마킹된 가솔린이 마킹되지 않은 가솔린과는 다를 수 있음을 납득하도록 설명한다.

[실시예 6]

[마킹된 약제의 분석]

20ppm의 고향 PBA를 함유하는, 파라세타몰(아세트아미노펜-가벼운 통증의 진정제 및 해열제) 및 나프록센(비-스테로이드 항-염제)의 마킹된 샘플들을 제조한다. 각 분량(1g)을 20ml의 유리병 내 10ml의 PBS/트윈

(실시에 4에 기술됨)에 첨가한다. 마찬가지로 두가지 물질에 대하여 마킹되지 않은 분석 대조물을 제조한다. 병을 빔새 텀블링시켜 PBA를 PBA/트윈 내로 추출한다. 원심분리시켜 용해되지 않은 물질을 분리한 후, 상등액의 샘플부분량(250 $\mu$ l)을 250 $\mu$ l의 PBA 특이적 항체에 첨가하고 실시에 4에 기술된 바와 유사하게, 분석 키트를 사용하여 분석한다. 표 3에 나타난 결과로부터, 마킹된 약제가 마킹되지 않은 약제와는 명백하게 구별됨을 알 수 있다.

[표 3]

약제	마킹되지 않음*	마킹됨*	비율(%)
파라세타몰	400	288	72
	394	275	70
	377	283	75
	378	278	74
	281	206	73
	266	203	76
	386	303	78
	398	267	67
	317	357	69
	480	378	79
	469	379	80
나프록센	평균비율 = 74	표준편차 = 4.2	편차율 = 5.7%
	517	350	68
	503	337	67
	355	260	73
	313	226	72
	279	185	66
	269	220	81
	269	204	76
	245	153	54
	평균비율 = 71	표준편차 = 5.7	편차율 = 8.0%

\* 실시에 4 에 기술된 튜브 광도계에 나타난 값을 읽는다.

[실시에 7]

[마킹된 향료의 분석]

20ppm의 PBA를 함유하는 오데 코롱의 샘플을 제조한다. 2ml의 마킹된 물질과 2ml의 마킹되지 않은 물질을 작은 유리시험관에 넣고 초기 건조되도록 안전한 공기 흐름 내에서 증발시킨다. 2ml의 PBS/트윈(실시에 4에 기술됨)을 오일성 잔류물에 첨가하고 튜브 내용물을 볼텍스에 의해 격렬하게 혼합한다. 물보다 무거운, 불용성 오일을 원심분리에 의해 분리하고 상등액의 샘플 분취량을 실시에 6에 기술된 바와 같이 분석한다. 표 3에 나타난 결과로부터 마킹된 향료가 마킹되지 않은 상당물과는 명백하게 다름을 알 수 있다.



[표 4]

항료	마킹되지 않음*	마킹됨*	비율(%)
오메코롱	866	104	12
	851	243	29
	655	107	16
	722	133	18
	710	126	18
	782	196	25
평균비율 = 20      표준편차 = 6.2      편차율 = 31.6%			

\* 나타낸 값을 실시예 4 에 기술된 튜브 광도계로부터 얻는다.

새로운 접근으로서 마킹된 및 마킹되지 않은 오메 코롱을 PBA/트윈으로 10배로 희석시키고 실시예 6에 기술된 바와 같이 직접 분석한다. 표 5에 결과를 나타내었으며 이 새로운 방법도 마킹되지 않은 항료와 마킹된 항료 사이에 명백한 차이가 있음을 보여준다.

[표 5]

항료	마킹되지 않음*	마킹됨*	비율(%)
오메코롱	736	499	68
	760	522	69
	494	324	66
	382	267	70
	401	233	58
	385	257	68
	352	210	60
	484	307	63
	640	426	67
평균비율 = 65.4      표준편차 = 4.2      편차율 = 6.4%			

[실시예 8]

[마킹된 음료의 분석]

20ppm의 PBA를 함유하는 블렌딩시킨 위스키 샘플을 제조한다. 마킹되지 않은 위스키의 상응하는 샘플 및 마킹된 위스키를 PBA/트윈으로 4배로 희석시키고 실시예 6에 기술된 방법을 사용하여 샘플 분취량(250μl)을 분석한다. 표 6에 나타난 결과는 마킹된 위스키가 마킹되지 않은 위스키와는 명백하게 다름을 설명한다.

[표 6]

음표	마킹되지 않음*	마킹됨*	비율(%)
위스키	375	119	31
	396	158	39
	381	180	47
	449	110	25
	435	104	24
	427	109	26
	431	95	22
	421	116	28
	387	117	30
	440	86	19
	412	122	30
	386	122	32
	353	107	30
	474	115	24
	452	106	23
	446	111	25
평균비율 = 28.4    표준편차 = 6.9    편차율 = 2.4%			

\* 나타낸 값은 실시예 4 에 기술된 튜브 광도계로부터 얻어진다. 이

실시예에서 생성된 신호를 전개시키는데 약 20 분이 소요됨에 유의한다.

(57) 청구의 범위

청구항 1

제품에 무해하며 제품에 대하여 불활성이며 제품과 미리 결합되어 있지 않은 합텐을 마커로서 제품과 결합시킨 다음, 이후에 제품을 확인하기 위한 수단으로서 상기 합텐을 이에 상보적인 결합 부재에 특이적으로 결합시킴에 의하여 제품 내에서 합텐을 검출하는 단계로 구성되는, 제품을 마킹하고 나서 제품을 확인하기 위한 수단으로 제품 내에서 마커 화합물을 검출하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 합텐 마커가 제품에 직접 첨가되는 방법.

청구항 3

제2항에 있어서, 합텐 마커가 제품과 혼합되는 방법.

청구항 4

제3항에 있어서, 제품이 액체인 방법.

청구항 5

제4항에 있어서, 제품이 석유 제품인 방법.

청구항 6

제2항에 있어서, 제품이 고체이고 합텐은 제품의 표면에 적용되는 방법.

청구항 7

제1항에 있어서, 합텐 마커가 제품과 결합된 태그(tag)나 포장지에 첨가되거나 부착되는 방법.

청구항 8

제1항에 있어서, 합텐 마커가 m-페녹시벤조산인 방법.

청구항 9

제1항에 있어서, 상보적 결합 부재가 합텐에 대한 항체인 방법.

청구항 10

(a) 상업적 석유 제품과 (b) 통상적으로는 상기 석유 제품에 결합되지 않는 합텐 마커를 함께 혼합하여 포함하는 마킹된 제품.